

## Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein

La présente invention concerne un procédé pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein. L'invention concerne également des amorces d'amplification et des sondes  
5 d'hybridation qui peuvent être mises en oeuvre dans ce procédé, ainsi qu'un kit de diagnostic/pronostic du cancer du sein.

Le cancer du sein est une maladie fréquente : une femme sur onze développe un cancer du sein au cours de sa vie. Cependant, parce qu'il existe différents types de cancers du  
10 sein, et différents pronostic du cancer du sein, les femmes qui en sont atteintes ne suivent pas toutes le même traitement : le médecin propose à chaque patiente un traitement adapté à sa situation, afin d'obtenir les meilleures chances de guérison.

Ainsi, l'hormonothérapie, qui est un traitement général dans les cancers du sein, est utilisé dans les cancers du sein hormono-dépendants, c'est à dire dans le cas de tumeurs  
15 exprimant des récepteurs hormonaux à la surface de leurs cellules. En post-opératoire, l'hormonothérapie peut être utilisée seule ou en relais de la chimiothérapie adjuvante. Dans le cadre d'une récurrence de la maladie, l'hormonothérapie peut être prescrite soit seule, soit associée ou en relais d'une chimiothérapie.

La chimiothérapie, est quant à elle, un traitement général du cancer puisque les  
20 médicaments, portés par la circulation sanguine, peuvent agir partout dans l'organisme. La chimiothérapie a une place importante dans l'arsenal thérapeutique, particulièrement depuis une dizaine d'années, avec l'apparition de nouvelles molécules. Les médicaments sont le plus souvent administrés en perfusion par voie veineuse, en voie sous-cutanée, en intra-musculaire.

25 Ainsi, en fonction de l'expression des récepteurs hormonaux à la surface des cellules hormonales, le traitement sera orienté vers une hormonothérapie ou non.

On peut citer notamment les récepteurs à l'œstrogène ESR1 et ESR2 et le récepteur à la progestérone (PGR), qui sont les paramètres les plus connus pour prédire la réponse à une hormonothérapie dans le cancer du sein. Ainsi la teneur en ESR1 est utilisé comme  
30 indicateur pronostic, et pour prédire la réponse d'un patient à un traitement avec des antioestrogènes, tels que le Tamoxifen® (Osborne C et al, Brest Cancer Res treat 51 :227-238, 1998 ; Goldhirsch et al, J Clin Oncol 19 :3817-3827, 2001). La présence

du récepteur PGR est également utilisée pour le suivi d'une hormonothérapie, et comme marqueur de pronostic (Horwitz et al, Recent Prog Horm Res 41 : 249-316, 1995). On peut également citer le récepteur HER2, qui serait surexprimé dans environ 1/4 des cancers du sein invasif (Slamon et al, Science, 1987, 235 :177-182)

- 5 Afin de proposer aux patients un traitement adapté, il est donc essentiel de connaître l'expression de gènes codant des récepteurs hormonaux, tels que ESR1, ESR2, HER2 et PGR. Cette expression est étudiée le plus souvent sur la tumeur primitive et le plus souvent par immunohistochimie. Dans les cas douteux, l'étude d'une amplification génique par hybridation in situ (FISH) est la méthode de référence, notamment dans le
- 10 cas de HER2. Depuis quelques années, des tumeurs de petites tailles peuvent être détectées, permettant un diagnostic précoce d'un cancer du sein, mais le pronostic de ce cancer reste alors difficile de part la faible quantité de tissu tumoral qui rend difficile la quantification protéique des récepteurs hormonaux mentionnés précédemment. Les techniques de biologie moléculaire deviennent alors indispensable pour la quantification
- 15 de récepteurs hormonaux, puisqu'elles nécessitent de plus petites quantités de tissu tumoral (Fuqua et al, Natl Cancer Inst 82 :859-861, 1997 ; Fasco et al, Anal Biochem, 245 : 167-178, 1997 ; Poola et al, Anal Biochem, 258 : 209-215, 1998).

La présente invention propose un nouveau procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein. Ce procédé met notamment en oeuvre de nouvelles séquences

20 nucléotidiques qui peuvent être utilisées en tant qu'amorces d'amplification ou de sondes d'hybridation. Le procédé selon l'invention permet notamment de déterminer quel est le traitement le plus adapté à un patient atteint d'un cancer du sein.

A ce titre, l'invention concerne un procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein comprenant les étapes suivantes :

- 25 A - on extrait le matériel nucléaire d'un échantillon biologique,  
B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire  
C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons
- 30 caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°24 et/ou lors de l'étape C), ladite

sonde de détection comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

5 D'une manière surprenante, les inventeurs ont ainsi découvert que l'utilisation, dans un procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein, d'une séquence nucléotidique comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie  
parmi les SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 est très pertinent en tant qu'amorce  
d'amplification pour amplifier des séquences cibles, tels que le gène codant ESR1,  
ESR2, PGR ou HER2. Les inventeurs ont également découvert que l'utilisation d'une  
10 séquence nucléotidique comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence  
nucléotidique choisie parmi les SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 en tant que sonde  
d'hybridation est très pertinente pour une hybridation spécifique sur des séquences  
cibles, tels que les gènes codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2.

15 Au sens de la présente invention, on entend par échantillon biologique, tout échantillon  
susceptible de contenir un matériel nucléique tel que défini ci après. Cet échantillon  
biologique peut être prélevé chez un patient et peut être notamment un échantillon de  
tissus, de sang, de sérum, de salive, de cellules circulantes du patient.  
Préférentiellement, cet échantillon biologique est prélevé d'une tumeur. On dispose de  
cet échantillon biologique par tout type de prélèvement connu de l'homme du métier.

20 Au sens de la présente invention, le matériel nucléique comprend une séquence d'acides  
nucléiques telle que séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou d'acides  
ribonucléiques (ARN). Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel  
nucléique comprend une séquence d'acides désoxyribonucléiques. Selon un mode  
préférentiel de réalisation de l'invention, le matériel nucléique est extrait d'un échantillon  
25 biologique prélevé chez un patient.

Par séquence nucléotidique (ou séquences d'acides nucléiques ou fragment  
nucléotidique ou oligonucléotide, ou polynucléotide), on entend un enchaînement de  
motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique,  
caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles  
30 de s'hybrider à une autre séquence d'acides nucléiques, l'enchaînement pouvant contenir  
des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide  
nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

Par motif nucléotidique, on entend un dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie  
5 parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou  
10 toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates. Ce matériel nucléique comprend au  
15 moins une séquence cible. Par séquence cible, on entend une séquence dont l'enchaînement en motifs nucléotidiques est spécifique d'un gène cible, tel que préférentiellement le gène codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence cible est comprise dans un gène choisi parmi les gènes codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2. Dans la suite de l'exposé, on parlera de  
20 séquence cible qu'elle soit en simple brin ou en double brin.

Lors de l'étape A, on extrait le matériel nucléique d'un échantillon biologique par tout protocole connu de l'homme du métier. A titre indicatif, l'extraction d'acides nucléique peut être réalisée par une étape de lyse des cellules présentes dans l'échantillon  
25 biologique, afin de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des cellules (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet WO00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique, WO99/53304 sur la lyse électrique, et WO99/15321 sur la lyse mécanique.  
30 L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US 5,234,809). Cette étape de lyse peut également être

- suivie d'une étape de purification, permettant la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques, et peut être adapté à la purification d'ADN ou d'ARN. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US 4,672,040 et US 5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO97/45202 et WO99/35500. Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne, soit sous forme de particules inertes (Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503) ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).
- Lorsque l'on souhaite extraire spécifiquement l'ADN d'un échantillon biologique, on peut notamment réaliser une extraction par du phénol, du chloroforme et de l'alcool pour éliminer les protéines et précipiter l'ADN avec de l'alcool 100%. L'ADN peut alors être culoté par centrifugation, lavé et remis en suspension .
- Lors de l'étape B, on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire.
- Au sens de la présente invention, on entend par amorce d'amplification, une séquence nucléique comprenant de 10 à 100 motifs nucléotidiques, préférentiellement de 15 à 25 motifs nucléotidiques. Cette amorce d'amplification comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°1 à 20. Au sens de la présente invention, une

amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de

- une séquence homologue à la SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20, c'est à dire
  - la séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire de la SEQ ID N°1 à 20
  - une séquence présentant une homologie suffisante pour s'hybrider à la SEQ ID N°1 à SEQ ID °20 ou à la séquence complémentaire à la SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20,

- une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 (ou une séquence homologue à SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases thymine,

et qui aurait la même fonction que l'amorce d'amplification selon l'invention, c'est à dire amplifier tout ou partie du gène codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2, est considérée comme équivalente à l'amorce d'amplification selon l'invention.

Une paire d'amorces d'amplification permet l'initiation d'une polymérisation enzymatique, telle que notamment une réaction d'amplification enzymatique.

Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies (ou amplicons) d'une séquence nucléique par l'action d'au moins une enzyme.

Au sens de la présente invention, on entend par amplicons les copies de la séquence cible obtenues lors d'une réaction d'amplification enzymatique. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159 ; la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184 ; la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069 ; la 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995 ; la NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, ou encore la TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

D'une manière générale, ces réactions d'amplification enzymatique mettent généralement une succession de cycle comprenant les étapes suivantes :

- la dénaturation de la séquence cible si celle ci est en double brin afin d'obtenir deux brins cibles, complémentaires,
  - l'hybridation de chacun des brins cibles, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente avec au moins une amorce d'amplification ,
- 5      ○ la formation à partir des amorces d'amplification des brins complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'une enzyme polymérase et de nucléosides triphosphate (ribonucléoside triphosphate et/ou desoxyribonucléoside triphosphate selon les techniques)

ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir la séquence cible dans  
10 une proportion suffisante pour permettre sa détection.

Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux séquences nucléiques telle que notamment une amorce d'amplification et une séquence cible ou une sonde d'hybridation et une séquence cible, se lient avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques pour former un double brin.

- 15 Ces liaisons hydrogènes se forment entre les bases complémentaires Adénine (A) et thymine (T) (ou uracile (U)) (on parle de liaison A-T) ou entre les bases complémentaires Guanine (G) et cytosine (C) (on parle de liaison G-C). L'hybridation de deux séquences nucléiques peut être totale (on parle alors de séquences complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu lors de cette hybridation
- 20 comprend uniquement des liaisons A-T et des liaisons C-G. Cette hybridation peut être partielle (on parle alors de séquences suffisamment complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu comprend des liaisons A-T et des liaisons C-G permettant de former le double brin, mais également des bases non liées à une base complémentaire. L'hybridation entre deux séquences complémentaires ou suffisamment complémentaires
- 25 dépend des conditions opératoires qui sont utilisées, et notamment de la stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases des deux séquences nucléiques, ainsi que par le degré de mésappariement entre ces deux séquences nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la
- 30 solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

D'une façon plus précise, la NASBA est une technologie d'amplification isotherme de l'acide nucléique reposant sur l'action conjointe de trois enzymes (transcriptase inverse AMV, Rnase-H et polymérase-ARN T7). Associée à des amorces d'amplification spécifiques d'une séquence cible, elle amplifie les cibles ARN plus d'un milliard de fois en 90 minutes. La réaction d'amplification se produit à 41°C et donne des molécules d'ARN simple brin comme produit final. La NASBA nécessite une paire d'amorce, dont au moins une comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Une telle amorce est préférentiellement choisie parmi les SEQ ID N°21 à 24. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces, utilisée de l'étape B, est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 202 paires de base, qui correspond à la séquence 1427-1629 sur la séquence du gène codant ESR1 de référence (Genbank X03635).
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient alors un



amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 184 paires de base, qui correspond à la séquence 2761-2945 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, 5 préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID 10 N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène ESR2, d'une taille de 210 paires de base, qui correspond à la séquence 1640-1850 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, 15 préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID 20 N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 185 paires de base, qui correspond à la séquence 2567-2752 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank NM\_00448).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, 25 préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ 30 ID N°13, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°14, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 858 paires de base,

10

qui correspond à la séquence 808-1666 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

5           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°15, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°16, on obtient  
10           alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 658 paires de base, qui correspond à la séquence 2319-2977 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

15           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°17, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°18, on obtient  
20           alors un amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 702 paires de base, qui correspond à la séquence 1246-1948 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437).

25           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°19, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°20, on obtient  
30           alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 928 paires de base, qui correspond à la séquence 2123-3051 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank NM\_004448).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces, utilisée de l'étape B, comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7, est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 5       ❑ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°21 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2;
- 10       ❑ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°22 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 15       ❑ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°23 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 20       ❑ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°24 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;

Afin de tenir compte de la variabilité d'efficacité enzymatique qui peut être observée lors des différentes étapes de la réaction d'amplification, on peut normaliser l'expression d'un gène cible par la détermination simultanée de l'expression d'un gène dit de ménage, dont l'expression est similaire chez les différents groupes de patients. En réalisant un rapport entre l'expression du gène cible et l'expression du gène de ménage, on corrige ainsi toute variabilité entre les différentes expérimentations. L'homme du métier pourra se référer notamment aux publications suivantes : Bustin SA *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29 : 23-39 ; Giulietti A *Methods*, 2001, 25 : 386-401. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise, en outre, lors de l'étape B, au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Par gène de ménage, on entend un gène dont l'expression est stable

dans un tissu donné, et quelque soit la situation physiologique. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le gène de ménage est le gène PPIB qui code la cyclophyline B. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend

5 au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 10      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ
- 15      ID N°28; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°27, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°28, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 239 paires de base, qui correspond à la séquence 231-470 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)
- 20      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ
- 25      ID N°26; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°25, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°26, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 639 paires de base, qui correspond à la séquence 11-650 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)
- 30      Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification utilisée pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant l'initiation de la

transcription par une polymérase du bactériophage T7. Ladite première amorce d'amplification est préférentiellement de SEQ ID N°30 et ladite deuxième amorce d'amplification comprend préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique  
5 SEQ ID N°28.

Lors de l'étape C, on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons. Cette étape de détection, peut être réalisée par tous les protocoles connus de l'homme du métier concernant la détection d'acides nucléiques.

10 Au sens de la présente invention, on entend par sonde d'hybridation une séquence nucléique de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 15 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec une séquence nucléique cible. La sonde d'hybridation peut comprendre un marqueur permettant sa détection. On parle alors de  
15 sondes de détection. Par détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une détection indirecte par une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6,  
20 p.173-249]. Par marqueur, on entend un traceur capable d'engendrer un signal que l'on peut détecter. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêta galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; les chromophores comme les  
25 composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par  
30 des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

Au sens de la présente invention, la sonde d'hybridation peut être une sonde dite de détection. Dans ce cas, la sonde dite de détection est marquée au moyen d'un marqueur tel que défini précédemment. Grâce à la présence de ce marqueur, on peut détecter la présence d'une réaction d'hybridation entre une sonde de détection donnée et la

5 séquence cible spécifique d'une espèce donnée.

La sonde de détection peut être notamment une sonde de détection « molecular beacons » telle que décrite par Tyagi & Kramer (Nature biotech, 1996, 14 :303-308). Ces "molecular beacons" deviennent fluorescentes lors de l'hybridation. Elles possèdent une structure de type tige-boucle et contiennent un fluorophore et un groupe

10 "quencher". La fixation de la séquence de boucle spécifique avec sa séquence complémentaire d'acide nucléique cible provoque un déroulement de la tige et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde qui convient.

La sonde d'hybridation peut être également une sonde dite de capture. Dans ce cas, la sonde dite de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout

15 moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption. On détecte alors la réaction d'hybridation entre une sonde de capture donnée et une séquence cible.

Pour la détection de la réaction d'hybridation, on peut utiliser des séquences cibles marquées, directement (notamment par l'incorporation d'un marqueur au sein de la

20 séquence cible) ou indirectement (notamment par l'utilisation d'une sonde de détection telle que définie précédemment) la séquence cible. On peut notamment réaliser avant l'étape d'hybridation une étape de marquage et/ou de clivage de la séquence cible, par exemple en utilisant un désoxyribonucléotide triphosphate marqué lors de la réaction d'amplification enzymatique. Le clivage peut être réalisé notamment par l'action de

25 l'imidazole et de chlorure de manganèse. La séquence cible peut aussi être marquée après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde de détection selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO 91/19812. Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR2 780 059.

30 Comme support solide, on peut utiliser des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose

tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO 94/12670, d'une particule.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher. Selon un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, la sonde d'hybridation comprend un fluorphore FAM (6-carboxy-fluorescein) ou ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en son extrémité 5' et un quencher (Dabsyl) en son extrémité 3'. Dans la suite de l'exposé, une telle sonde d'hybridation est appelée « molecular beacon ».

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les étapes B et C sont effectuées en même temps. Ce mode préféré peut être mise en oeuvre par «NASBA en temps réel» qui regroupe en une étape unique la technique d'amplification NASBA et la détection en temps réel qui fait appel à des "molecular beacons". La réaction NASBA intervient dans le tube, produisant de l'ARN simple brin avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent. Contrairement à une amplification par RT-PCR, l'amplification en NASBA peut se faire en présence d'ADN dans l'échantillon. Il n'est donc pas nécessaire de vérifier que l'ADN a bien été complètement éliminé lors de l'extraction des ARN.

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible codant ESR1 (séquence de référence NCBI accession number : X03635), on utilise préférentiellement lors de l'étape b)

- une première amorce de SEQ ID N°1 ou 21
- une deuxième amorce de SEQ ID N°2

et lors de l'étape c)

- une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°9.

16

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible codant PGR (séquence de référence NCBI accession number : NM\_000926), on utilise préférentiellement lors de l'étape b)

- ☐ une première amorce de SEQ ID N°3 ou 22
  - 5 ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°4
- et lors de l'étape c)
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°10

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible codant ESR2 (séquence de référence NCBI accession number : MN\_001437), on utilise

- 10 préférentiellement lors de l'étape b)
- ☐ une première amorce de SEQ ID N°5 ou 23
  - ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°6
- et lors de l'étape c)
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°11

- 15 Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible codant HER2 (séquence de référence NCBI accession number : NM\_00448), on utilise préférentiellement lors de l'étape b)

- ☐ une première amorce de SEQ ID N°7 ou 24
  - ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°8
- 20 et lors de l'étape c)
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°12

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène de ménage PPIB (séquence de référence NCBI accession number : M60857), on utilise préférentiellement lors de l'étape b)

- 25 ☐ une première amorce de SEQ ID N°27 ou 30
- ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°28
- et lors de l'étape c)
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°29

- 30 Lorsqu'on utilise, lors de l'étape B, une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage, lesdits amplicons spécifiques d'un gène de ménage peuvent être détectés comparablement à ce qui est décrit



précédemment, par notamment l'utilisation d'une sonde de détection. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le gène de ménage est le gène PPIB qui code la cyclophyline B et la sonde de détection comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°27 à 29. Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

L'invention concerne également une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15, et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'amorce d'amplification comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Cette amorce peut être notamment l'une quelconque des SEQ ID N°21 à 24, et est préférentiellement utilisée dans une réaction d'amplification NASBA.

L'invention concerne également une paire d'amorce choisi parmi les paires d'amorces suivantes :

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 202 paires de base, qui correspond à la séquence 1427-1629 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID

N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 184 paires de base, qui correspond à la séquence 2761-2945 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ
- 10      ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 210 paires de base, qui correspond à la séquence 1640-1850 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)
- 15      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ
- 20      ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 185 paires de base, qui correspond à la séquence 2567-2752 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank MN\_004448).
- 25      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ
- 30      ID N°14 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°13, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°14, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 858 paires de base,

qui correspond à la séquence 808-1666 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°15, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°16, on obtient  
10      alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 658 paires de base, qui correspond à la séquence 2319-2977 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).
- 15      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°17, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°18, on obtient  
20      alors un amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 702 paires de base, qui correspond à la séquence 1246-1948 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)
- 25      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°19, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°20, on obtient  
30      alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 928 paires de base, qui correspond à la séquence 2123-3051 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank MN\_004448).

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Cette amorce peut être notamment l'une quelconque des SEQ ID 21 à 24. Lorsque première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7, cette première amorce est  
5 préférentiellement comprise dans une paire d'amorces choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 10 ☐ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°21 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2;
- 15 ☐ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°22 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- ☐ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°23 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 20 ☐ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°24 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce d'amplification  
25 telle que définie précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorce telle que définie précédemment lors d'une réaction d'amplification NASBA.

L'invention concerne également une amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Cette amorce d'amplification comprend  
30 préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.

L'invention concerne également une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage, choisie parmi les paires suivantes :

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°27, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°28, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 239 paires de base, qui correspond à la séquence 231-470 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°25, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°26, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 639 paires de base, qui correspond à la séquence 11-650 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification utilisée pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Ladite première amorce d'amplification est préférentiellement de SEQ ID N°30 et ladite deuxième amorce d'amplification comprend préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28.

L'invention concerne également une sonde de détection comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un fluorophore et un quencher.

L'invention concerne également une sonde d'hybridation pour détecter des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Préférentiellement, cette sonde de détection comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°27 à 29.

5 Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un flurophore et un quencher.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce telle que définie précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorces telle que définie précédemment et/ou d'au moins une sonde de détection telle que définie précédemment pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein.

10 L'invention concerne enfin un kit pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein comprenant au moins une amorce telle que définie précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorces telle que définie précédemment et/ou d'au moins une sonde de détection telle que définie précédemment.

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible

15 codant ESR1, le kit comprend préférentiellement

- ☐ une première amorce de SEQ ID N°1 ou 21
- ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°2
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°9.

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible

20 codant PGR, le kit comprend préférentiellement

- ☐ une première amorce de SEQ ID N°3 ou 22
- ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°4
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°10

Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible

25 codant ESR2 (séquence de référence NCBI accession number : MN\_001437), le kit comprend préférentiellement

- ☐ une première amorce de SEQ ID N°5 ou 23
- ☐ une deuxième amorce de SEQ ID N°6
- ☐ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°11

30 Tel que présenté dans l'exemple ci après, lorsque l'on souhaite détecter le gène cible codant HER2 (séquence de référence NCBI accession number : NM\_00448), le kit comprend préférentiellement

23

- ❑ une première amorce de SEQ ID N°7 ou 24
- ❑ une deuxième amorce de SEQ ID N°8
- ❑ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°12

Tel que présenté dans l'exemple ci après, et selon un mode particulier de réalisation de

5 l'invention, le kit comprend en outre

- ❑ une première amorce de SEQ ID N°27 ou 30
- ❑ une deuxième amorce de SEQ ID N°28
- ❑ une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°29

10 La figure suivante est donnée à titre illustrative et n'a aucun caractère limitatif. Elle permettra de mieux comprendre l'invention.

La figure 1 représente les courbes standards obtenues pour les gènes ESR1 (fig 1a), PGR (fig 1b), ESR2 (fig 1c), HER2 (fig 1d), et PPIB (fig 1e) telles que décrites dans l'exemple 1-3a. Chaque courbe standard, obtenue pour chaque gène à partir d'une  
15 séquence de référence qui est spécifique du gène, transcrits en ARN in vitro dans un plasmide, représente le temps d'apparition de la phase exponentielle de l'amplification (on parle également de TTP : time to positivity, temps seuil) en fonction du nombre de copies d'ARN présentes au début de l'amplification par NASBA (plus la quantité de départ de copies d'ARN est importante au début de l'amplification, plus le temps  
20 d'apparition de la phase exponentielle est court).

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

## 25 **Exemple 1 - Amplification et détection en temps réel des ARNm codant ESR1, PGR, ESR2 et HER2**

### **1/ Obtention et préparation des échantillons**

Cet exemple a été réalisé à partir de trois lignées de cellules tumorales, dont  
30 l'expression en récepteurs hormonaux a préalablement été déterminée par IHC ou radioligand (ou LBA), ont été utilisées : MCF-7 (exprimant les récepteurs ESR1 et PGR), T47D (n'exprimant pas le récepteur ESR1 et exprimant le récepteur PGR) et BT-

549 (n'exprimant ni le récepteur ESR1, ni le récepteur PGR). Ces lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Ces lignées cellulaires ont été mises en culture dans un milieu DMEM (MCF-7) ou RPMI 1640 (T47D et BT-549), supplémenté en sérum fœtal de bœuf (10%), L glutamine (2mM),  
5 acides aminés non essentiels (1%) et streptomycine (10 µg/ml) à 37°C sous atmosphère comprenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Cet exemple a également été réalisé à partir de tumeurs de patientes (n=102) atteintes d'un cancer du sein dont l'expression en récepteurs hormonaux ER et PR (appelé également ESR1 et PGR) était préalablement déterminée par radioligand (LBA) selon  
10 une technique classique connue de l'homme du métier. La technique LBA nous renseignait sur la présence de récepteurs ER et PR fonctionnels dans le cytosol des cellules. L'expression en HER2 était préalablement déterminé par PCR quantitative (nous renseignant sur l'amplification du gène HER2) et ELISA (nous renseignant sur l'expression de la protéine membranaire codée par le gène HER2) selon une technique  
15 classique connue de l'homme du métier.).

## **2/ Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été extraits de lignées cellulaires, par l'utilisation de Trizol® Reagent selon les recommandations des fournisseur du kit (Invitrogen, Canada). La  
20 qualité et la quantité en ARN ont été déterminées à 260 et 280 nm et contrôlées sur gel agarose. Les ARN ont ensuite été congelés à -70°C jusqu'à utilisation.

Des ARN totaux ont également été extraits d'une façon comparable de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein.

## **3) Amplification par NASBA**

La réaction d'amplification par NASBA est basée sur l'activité simultanée d'une reverse transcriptase du virus aviaire myéloblaste (AMV-RT), d'une RNase H d'E. coli et d'une ARN polymérase du bacteriophage T7 (Compton J, 1991, Nature, 350 : 91-92). La détection en temps réel des amplicons est réalisée par l'utilisation d'un lecteur  
30 Nuclisens EasyQ® (bioMérieux BV, The Netherlands) et sondes de détection « molecular beacons », telles que définies précédemment. La quantification en NASBA est basée sur l'utilisation d'une courbe standard, obtenue à partir d'une séquence de



référence, spécifique du gène cible, transcrits en ARN in vitro dans un plasmide. Cette courbe standard représente le temps d'apparition de la phase exponentielle de l'amplification en fonction du nombre de copies d'ARN présentes au début de l'amplification par NASBA (plus la quantité de départ de copies d'ARN est importante au début de l'amplification, plus le temps d'apparition de la phase exponentielle est court).

**a) Amplification des gènes ESR1, PGR, ESR2, HER2 et du gène de ménage PPIB -  
Obtention d'une courbe standard**

**10        *Courbe standard du gène cible codant ESR1***

Pour le gène cible codant ESR1 (séquence de référence NCBI accession number : X03635), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°13 5' TACAGGCCAA ATTCAGATAA TCGAC 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°14 5' GGAACCGAGAT GATGTAGCCA 3', localisées respectivement en position 808-832 et 1646-1666 de la séquence de référence, afin de générer en PCR (un 1er cycle de dénaturation (95°C; 1 min); puis 35 cycles comprenant les étapes suivantes : dénaturation: 94°C; 1 min ; hybridation: 60°C; 1 min ; élongation: 72°C; 2 min) et un dernier cycle comprenant une étape de dénaturation: 72°C; 7 min) un amplicon de 858 paires de bases, spécifique du gène codant ESR1 (on parlera d' « amplicon ESR1 »).

20 Les amplicons ESR1 obtenus tels que décrit ci dessus, ont ensuite été clonés en plasmide pGEM-T (Promega, Madison, USA).

La séquence de ces amplicons ESR1 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène ESR1.

25 Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés 30 (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces

dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence des amorces spécifiques ESR1 SEQ ID N° 1 et ESR1 N°2 et du « molecular beacons » SEQ ID N°9 :

- 5      □ 0,2µM d'une première amorce ESR1 de SEQ ID N°1 5' CTCCACCATG  
CCCTCTACAC A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule,  
une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une  
première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°21 : 5' aattctaata  
cgactcacta tagggagaag gCTCCACCAT GCCCTCTACA CA 3',
- 10      □ 0,2 µM d'une deuxième amorce ESR1 de SEQ ID N°2 5' ACATGATCAA  
CTGGGCGAAG A 3').
- 15      □ 0,1µM de «molecular beacons» comprenant la SEQ ID N°9 5'  
GATCCTGATGATTGGTCTCG 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-  
carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence  
complète : 5' FAM-cgatcgGATC CTGATGATTG GTCTCGcgat cg-Dabsyl 3'.
- 20      Au cours de l'amplification le signal s'intensifie proportionnellement à la quantité  
d'amplicons produits. La courbe de fluorescence en fonction du temps permet de définir  
le temps ou la phase exponentielle de l'amplification démarrera (encore appelé TTP :  
time to positivity, temps seuil). La courbe standard ESR1 relie le nombre de transcrit  
présent au départ dans la solution en fonction du TTP détecté lors de l'amplification  
20      NASBA. A l'aide d'une courbe standard, on calcule de manière absolue le nombre de  
copies du gène cible. Enfin cette valeur est normalisée grâce à un gène de ménage, en  
l'occurrence le gène PPIB. Cette courbe standard ESR1, représentée figure 1a.

#### ***Courbe standard du gène cible codant PGR***

La courbe du gène cible codant PGR a été réalisée selon le même principe que pour  
25      ESR1, à l'exception des amorces d'amplification utilisées et des «molecular beacons »,  
qui étaient spécifiques de PGR.

Ainsi, pour le gène cible codant PGR (séquence de référence NCBI accession number :  
NM\_000926), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°15 5'  
TGACAAGTCT TAATCAACTA GG 3'et une deuxième de SEQ ID N°16 5'  
30      TCACTTTTAT GAAAGAGAAG GG 3', localisées respectivement en position 2319-  
2340 et 2955-2977 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons PGR a  
été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il

correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène PGR.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock : 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl, dilution en cascade 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl à 0,2.10<sup>2</sup> copies/μl). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence

- 0,1μM d'une première amorce PGR de SEQ ID N°3 5' TCCCTGCCAA TATCTTGGGT A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°22 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTCCCTGCCA ATATCTTGGG TA 3',
- 0,1 μM d'une deuxième amorce PGR de SEQ ID N°4 5' AGTTGTGTTCG AGCTCACAGC 3',
- 0,1 μM de « molecular beacons » utilisées comprenant la SEQ ID N°10 5' CGGGCACTGAGTGTTGAATT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' (séquence complète : 5' FAM-cgatcgCGGG CACTGAGTGT TGAATTcgat cg-Dabsyl 3').

La courbe standard PGR est représentée figure 1B.

#### ***Courbe standard du gène cible codant ESR2***

La courbe du gène cible codant ESR2 a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification utilisées et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de ESR2.

Ainsi, pour le gène cible codant ESR2 (séquence de référence NCBI accession number : MN\_001437), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°17 5' GCCGCCCCAT GTGCTGAT 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°18 5' GGACCCCGTGA TGGAGGACTT 3', localisées respectivement en position 1246-

1263 et 1928-1948 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons ESR2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène ESR2.

- 5 Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymerase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).
- 10 Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :
  - $0,2 \mu$ M d'une première amorce ESR2 de SEQ ID N°5 5' TGAGCAGATG  
15 TTCCATGCCC T 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°23 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTGAGCAGAT GTTCCATGCC CT 3',
  - $0,2 \mu$ M d'une deuxième amorce ESR2 de SEQ ID N°6 5' TCCAGTATGT  
20 ACCCTCTGGT 3',
  - $0,1 \mu$ M de « molecular beacons » comprenant la SEQ ID N°11 5' GATGCTTTGGTTTGGGTGAT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3'.

La courbe standard ESR2 est représentée figure 1C.

#### 25 ***Courbe standard du gène cible codant HER2***

La courbe du gène cible codant HER2 a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de HER2.

Ainsi, pour le gène cible codant HER2 (séquence de référence NCBI accession number :

- 30 NM\_00448), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°19 5' TGGTTGGCAT TCTGCTGGTC GTGGT 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°20 5' TGGCCGACAT TCAGAGTCAA TCATC 3', localisées respectivement en position

2123-2147 et 3027-3051 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons HER2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène HER2.

- 5 La séquence de ces amplicons HER2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène HER2.

10 Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA)), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

15 Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock : 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl, dilution en cascade 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl à 0,2.10<sup>2</sup> copies/μl). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :

- 20 □ 0,2μM d'une première amorce HER2 de SEQ ID N°7 5' GAGCCAGCCC GAAGTCTGTA 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°24 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag g GAGCCAGC CCGAAGTCTG TA 3',
- 0,2 μM d'une deuxième amorce HER2 de SEQ ID N°8 5' TCTTAGACCA TGTCCGGGAA A 3',
- 25 □ 0,1 μM de « molecular beacons » utilisées comprenait la SEQ ID N°12 5' GGAGGATGTG CGGCTCGTAC 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3'.

La courbe standard HER2 est représentée figure 1D.

30 ***Courbe standard du gène cible PPIB***

La courbe du gène cible PPIB a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de PPIB.

Ainsi, pour le gène de ménage PPIB (séquence de référence NCBI accession number :

5 M60857), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°25 5' ACATGAAGGT GCTCCTTGCC 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°26 5' GTCCCTGTGC CCTACTCCTT 3', localisées respectivement en position 11-30 et 631-650 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons PPIB a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait  
10 bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène PPIB.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été  
15 purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock : 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl, dilution en cascade 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl à 0,2.10<sup>2</sup> copies/μl). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic®  
20 (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :

- 0,2 μM d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5'  
25 aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCTG TGA 3',
- 0,2 μM d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'
- 0,1μM de « molecular beacons » comprenant la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-cgatcgATC CAGGGCGGAG ACTTCa<sub>gat cg</sub>-Dabsyl 3'.

La courbe standard PPIB est représentée figure 1E.

b) réaction d'amplification par NASBA :

## b1) Amplification en duplex des gènes ESR1 et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiothreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

10 Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°9 5' GATCCTGATGATTGGTCTCG 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un «quencher» (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' FAM-cgatcgGATC CTGATGATTG GTCTCGcgat cg-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène ESR1

15 □ la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un «quencher» (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-cgatcgGATC CAGGGCGGAG ACTTCagat cg-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB,

Dans ce milieu a également été ajouté :

20 □ 0,2µM d'une première amorce ESR1 de SEQ ID N°1 5' CTCCACCATG CCCTCTACAC A 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°21 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCTCCACCAT GCCCTCTACA CA 3',

25 □ 0,2 µM d'une deuxième amorce ESR1 de SEQ ID N°2 5' ACATGATCAA CTGGGCGAAG A 3',

□ 0,2 µM d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGA CTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3',

30

- 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5  $\mu$ l d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U

5 d'ARN polymérase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal

10 fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ.

L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour la

15 quantification de l'expression de chacun du gène cible ESR1 et du gène de ménage PPIB, afin d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon. La quantification de l'expression d'un gène cible a été exprimé par nombre de copies d'ARNm/ 5ng d'ARN totaux.

Le tableau 1 présente l'expression du gène ESR1 quantifiée à partir de 5 ng d'ARN

20 totaux provenant des lignées cellulaires MCF-7, T47D et BT-549.

	Nbre copies ARNm ESR1	Nbre copies ARNm PPIB	ESR1/PPIB
MCF-7	$2,24 \times 10^4$	$7,43 \times 10^3$	$3,01 \times 10^{-2}$
T47D	$3,24 \times 10^4$	$2,34 \times 10^6$	$1,38 \times 10^{-2}$
BT549	NC	$4,43 \times 10^6$	NC

Tableau 1 - Expression du gène ESR1 dans les cellules MCF-7, T47D, BT-549 (NC : non calculable)

25 L'expression du gène ESR1 a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Ainsi, des ARNm de ESR1 étaient exprimés dans les cellules MCF-7 alors qu'ils n'étaient pas détectés dans les cellules BT-549, en accord avec l'expression en récepteurs hormonaux de ces cellules. A noter que des ARNm de ESR1 étaient exprimés dans les



cellules T47D, alors que seul le récepteur PGR était exprimé, suggérant une régulation post transcriptionnelle du gène ESR1.

- 5 Le tableau 2 présente l'expression du gène ESR1 quantifiée à partir de 50 ng d'ARN totaux provenant de tumeurs IHC +, c'est à dire exprimant des récepteurs hormonaux nucléaires des cellules tumorales, ou de tumeurs IHC-, c'est à dire n'exprimant pas de récepteurs hormonaux nucléaires (moyenne sur 3-7 tumeurs).

	Moyenne copies ARNm ESR1	Moyenne copies ARNm PPIB	ESR1/PPIB
Tumeurs IHC +	$2.64 \times 10^3$	$4.71 \times 10^6$	$5.61 \times 10^{-4}$
Tumeurs IHC -	$9.62 \times 10^3$	$9.39 \times 10^6$	$1.02 \times 10^{-3}$

Tableau 2 - Expression du gène ESR1 dans les tumeurs IHC + et IHC -

10

L'expression du gène ESR1 a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Une surexpression du gène ESR1 était observée dans les tumeurs IHC +.

- 15 A partir des courbes standards ESR1 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour les gènes ESR1 et PPIB amplifiés en duplex. La limite de quantification était observée à 100 copies d'ARNm pour ESR1 et PPIB. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour ESR1 et PPIB.
- 20 La spécificité du duplex ESR1/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR1 en présence de « molecular beacon » spécifique de PGR, et en réalisant l'amplification de PGR en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR1. Aucun signal n'était détecté. De même, aucun signal n'était observé lorsque la NASBA était réalisé à partir d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire BT-549, ESR1 et PGR négative.

25

- Tous ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une autre technique d'amplification (RT-PCR quantitative). De plus, les résultats obtenus au niveau ARN messager par la technique NASBA pour le gène ESR1 était corrélés à ceux obtenus au niveau protéique par LBA (Ligand Binding Assay) (ESR:  $r = 0,77$ ,  $p < 0,0001$ ; test statistique de corrélation Spearman). Ces résultats démontrent que l'expression des
- 30

ARNm de ESR1 est corrélé à la présence du récepteur fonctionnel dans le cytosol, confirmant l'intérêt d'étudier au niveau ARNm l'expression de ce gène.

Ces résultats démontrent que le duplex ESR1/PPIB en NASBA permet une quantification de l'expression du gène ESR1 à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, et, d'une façon plus large, à partir d'une très faible quantité de cellules tumorales, et est parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.

#### b2) Amplification en duplex des gènes PGR et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiothreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°10 5' CGGGCACTGAGTGTGAATT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' (séquence complète : 5' FAM-*cgatcg*CGGG CACTGAGTG T TGAATT*cg at cg*-Dabsyl 3') pour la détection des ARN codant PGR lors du duplex PGR / cyclophyline B,
- la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTCA*cgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB,

Dans ce milieu a également été ajouté :

- 0,1µM d'une première amorce PGR de SEQ ID N°3 5' TCCCTGCCAA TATCTTGGGT A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°22 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTCCCTGCCA ATATCTTGGG TA 3',

□ 0,1  $\mu$ M d'une deuxième amorce PGR de SEQ ID N°4 5' AGTTGTGTCG AGCTCACAGC 3',

□ 0,2  $\mu$ M d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3',

□ 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

10 Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5  $\mu$ l d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymérase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel selon un principe comparable à ce qui a été décrit pour ESR1. La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour la quantification de l'expression du gène cible PGR et du gène de ménage PPIB, afin d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon. La quantification de l'expression d'un gène cible a été exprimé par nombre de copies d'ARNm/ 5ng d'ARN totaux.

Le tableau 3 présente l'expression du gène PGR quantifiée à partir de 5 ng d'ARN totaux provenant des lignées cellulaires MCF-7, T47D et BT-549.

	Nbre copies ARNm PGR	Nbre copies ARNm PPIB	PGR/PPIB
MCF-7	$4,35 \times 10^2$	$2,54 \times 10^6$	$1,71 \times 10^{-4}$
T47D	$3,92 \times 10^4$	$8,32 \times 10^5$	$4,71 \times 10^{-2}$
BT549	NC	$9,73 \times 10^5$	NC

Tableau 3 - Expression du gène PGR dans les cellules MCF-7, T47D, BT-549

L'expression du gène PGR a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Ainsi, des ARNm de PGR étaient exprimés dans les cellules MCF-7 et T47D alors qu'ils n'étaient

pas détectées dans les cellules BT-549, en accord avec l'expression en récepteurs hormonaux de ces cellules.

Le tableau 4 présente l'expression du gène PGR quantifiée à partir de 50 ng d'ARN totaux provenant de tumeurs IHC +, c'est à dire exprimant des récepteurs hormonaux à la surface des cellules tumorales, ou de tumeurs IHC-, c'est à dire n'exprimant pas de récepteurs hormonaux à leur surface (moyenne sur 3-7 tumeurs).

	Moyenne copies ARNm PGR	Moyenne copies ARNm PPIB	PGR/PPIB
Tumeurs IHC +	$2,78 \times 10^3$	$9,23 \times 10^7$	$3,01 \times 10^{-4}$
Tumeurs IHC -	$2,98 \times 10^3$	$1,91 \times 10^8$	$1,56 \times 10^{-4}$

**Tableau 4 - Expression du gène PGR dans les tumeurs IHC + et IHC -**

L'expression du gène PGR a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Une surexpression du gène PGR était observée dans les tumeurs IHC +.

A partir des courbes standards PGR et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour les gènes PGR et PPIB amplifiés en duplex. La limite de quantification a été déterminée à 100 et 1000 copies d'ARNm pour PGR et PPIB respectivement. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour PGR et PPIB.

La spécificité du duplex PGR/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de PGR en présence de «molecular beacon» spécifique de ESR1. Aucun signal n'était détecté. De même, aucun signal n'était observé lorsque la NASBA était réalisé à partir d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire BT-549, PGR négative.

Tous ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une autre technique d'amplification (RT-PCR quantitative). De plus, les résultats obtenus au niveau ARN messenger par la technique NASBA pour le gène PGR était corrélés à ceux obtenus au niveau protéique par LBA (Ligand Binding Assay) (PGR :  $r=0,87$ ,  $p<0,0001$ ,  $n=102$ ; test statistique de corrélation Spearman). Ces résultats démontrent que l'expression des

ARNm de PGR est corrélé à la présence du récepteur fonctionnel dans le cytosol, confirmant l'intérêt d'étudier au niveau ARNm l'expression de ce gène.

Ces résultats démontrent que le duplex PGR/PPIB en NASBA permet une quantification de l'expression du gène PGR à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, et, d'une façon plus large, à partir d'une très faible quantité de cellules tumorales, et est parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.

### 10 b3) Amplification en duplex des gènes ESR2 et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 15 70mM KCl, 5mM dithiotreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°11 5' GATGCTTTGGTTTGGGTGAT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un «quencher» (Dabsyl) en 3',
- la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un «quencher» (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-cgatcgGATC CAGGGCGGAG ACTTCacgat cg-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB codant la cyclophyline B,

Dans ce milieu a également été ajouté :

- 0,2µM d'une première amorce ESR2 de SEQ ID N°5 5' TGAGCAGATG TTCCATGCCC T 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°23 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTGAGCAGAT GTTCCATGCC CT 3',

- 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce ESR2 de SEQ ID N°6 5' TCCAGTATGT ACCCTCTGGT 3',
  - 0,2  $\mu$ M d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en
- 5 minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3', 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

10 Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5  $\mu$ l d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymerase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

15 La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par

20 contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ. L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour quantifier l'expression de chacun du gène cible ESR2 et du gène de ménage PPIB, ce qui a permis d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon.

25 A partir des courbes standards ESR2 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour chacun des gènes. La limite de quantification était observée à 1000 et 10000 copies d'ARNm pour ESR2 et PPIB. La limite de détection était de 1000 copies d'ARNm pour ESR2 et PPIB.

30 La spécificité du duplex ESR2/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR2 en présence de « molecular beacon » spécifique de HER2, et en réalisant l'amplification de HER2 en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR2. Aucun signal n'était détecté.

Ces résultats démontrent que le duplex ESR2/PPIB en NASBA permet une amplification spécifique et sensible du gène ESR2 à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, rendant ce duplex parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.

#### b2) Amplification en duplex des gènes HER2 et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiotreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- 15     □ la SEQ ID N°12 5' GGAGGATGTG CGGCTCGTAC 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' pour la détection des ARN codant HER2 lors du duplex HER2 / PPIB,
- 20     □ la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGC GGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTC*Acgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB codant la cyclophyline B,

Dans ce milieu a également été ajouté :

- 25     □ 0,2 µM d'une première amorce HER2 de SEQ ID N°7 5' GAGCCAGCCC GAAGTCTGTA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°24 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag g GAGCCAGC CCGAAGTCTG TA 3',
- 30     □ 0,2 µM d'une deuxième amorce HER2 de SEQ ID N°8 5' TCTTAGACCA TGTCGGGAA A 3',

- 0,2  $\mu$ M d'une première amorce cyclophyline B de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3', 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce cyclophyline B de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5  $\mu$ l d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymérase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ. L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour quantifier l'expression de chacun du gène cible HER2 et du gène de ménage PPIB, ce qui a permis d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon.

A partir des courbes standards HER2 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour chacun des gènes. La limite de quantification a été déterminée à 1000 et 10000 copies d'ARNm pour HER2 et PPIB respectivement. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour HER2 et PPIB.

La spécificité du duplex HER2/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR2 en présence de « molecular beacon » spécifique de HER2, et en réalisant l'amplification de HER2 en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR2. Aucun signal n'était détecté.



Les résultats obtenus au niveau ARN messenger par la technique NASBA pour le gène HER2 était corrélé au résultats obtenus en PCR quantitative ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=97$ , test statistique de corrélation Sperman) et en ELISA ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 93$ ; test statistique de corrélation Spearman). Ces résultats démontrent que l'expression des

5 ARNm d'HER2 est corrélé à l'amplification du gène ainsi qu'à la surexpression du récepteur membranaire HER2, confirmant l'intérêt d'étudier au niveau ARNm l'expression de ce gène.

Ces résultats démontrent que le duplex HER2/PPIB en NASBA permet une amplification spécifique et sensible du gène HER2 à partir d'une très faible quantité

10 d'ARN totaux, rendant ce duplex parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein comprenant les étapes suivantes :

- 5           A - on extrait le matériel nucléaire d'un échantillon biologique,  
          B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire  
          C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons

- 10       caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 et/ou lors de l'étape C), ladite sonde de détection comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID  
15       N°1 à SEQ ID N°20.

2. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein selon la revendication 1 caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorces est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 20       □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
- 25       □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 30       □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;

- ❑ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;
  - 5 

❑ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ;
  - 10 

❑ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ;
  - 15 

❑ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ;
  - 20 

❑ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20.
3. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein selon l'une quelconque des revendication 1 ou 2 dans lequel ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.
- 25
4. Procédé pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel, lors de l'étape C, la sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel la séquence cible est comprise dans un gène choisi parmi ESR1, ESR2, PGR, HER2.
- 5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel les étapes B et C sont effectuées en même temps.
- 10 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'on utilise, en outre, lors de l'étape B, au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage.
8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.
- 15 9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que ladite paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :
- 20 ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28
- 25 ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26
10. Amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 ; 25 à 29.

11. Amorce d'amplification selon la revendication 10 comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

5 12. Paire d'amorce d'amplification choisie parmi les paires d'amorces suivantes :

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
- 10 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 15 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 20 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;
- 25 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ;
- 30 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ;
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une

deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ;

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20

5

13. Paire d'amorce selon la revendication 12 dans laquelle ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

10

14. Utilisation d'au moins une amorce d'amplification selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'une paire d'amorce selon la revendication 12 ou 13 lors d'une réaction d'amplification NASBA

15

15. Sonde de détection comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

16. Sonde de détection selon la revendication 15 comprenant un fluorphore et un quencher.

20

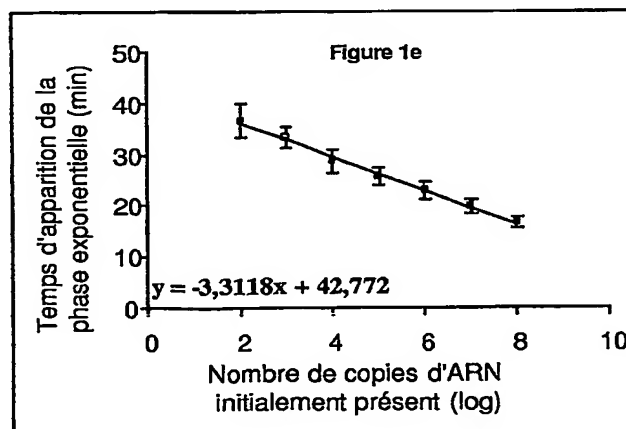
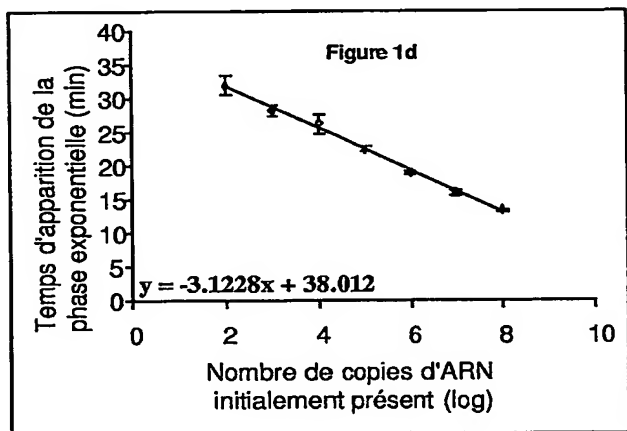
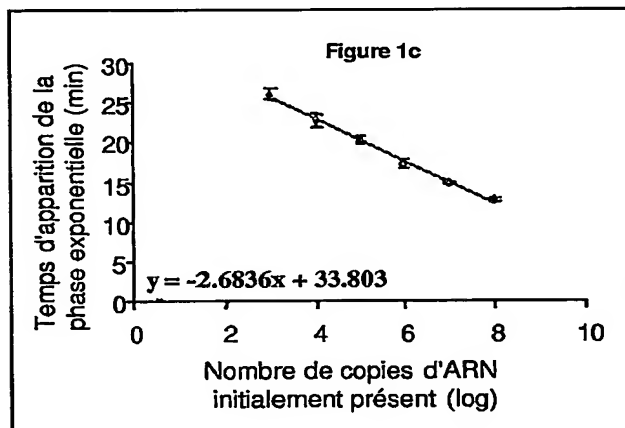
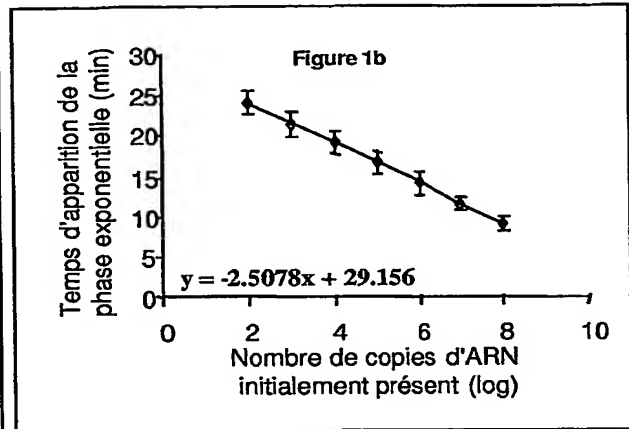
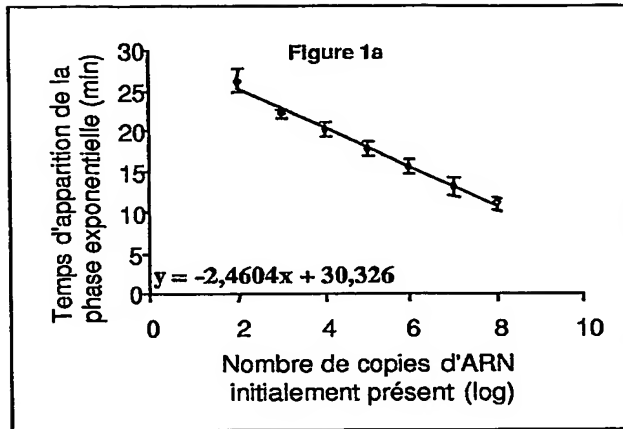
17. Utilisation d'au moins une amorce selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 12 ou 13 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 15 ou 16 pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein.

25

18. Kit pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein comprenant au moins une amorce selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 12 ou 13 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 15 ou 16.

30

1 / 1



## SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux SA

<120> Procédé de diagnostic et/ou de pronostic du cancer du sein

<130> Unknown

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctccaccatg ccctctacac a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

acatgatcaa ctgggcgaag a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 3  
tccctgccaa tatcttgggt a 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4  
agttgtgtcg agctcacagc 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5  
tgagcagatg ttccatgccc t 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6  
tccagtatgt accctcttgt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7  
gagccagccc gaagtctgta 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tcttagacca tgtccgggaa a

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gatcctgatg attggtctcg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

cgggcactga gtgttgaatt

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gatgctttgg tttgggtgat

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggaggatgtg cggctcgtac

20

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

tacaggccaa attcagataa tcgac

25

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

ggaaccgaga tgatgtagcc a

21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tgacaagtct taatcaacta gg

22

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16  
tcactttttaa tgaaagagaa ggg 23

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17  
gccgccccat gtgctgat 18

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18  
ggacccccgtg atggaggact t 21

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19  
tggttggcat tctgctggtc gtggt 25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20  
tggccgacat tcagagtcaa tcata 25

<210> 21

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

aattctaata cgactcacta tagggagaag gctccaccat gccctctaca ca 52

<210> 22

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

aattctaata cgactcacta tagggagaag gtccttgcca atatcttggg ta 52

<210> 23

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

aattctaata cgactcacta tagggagaag gtgagcagat gttccatgcc ct 52

<210> 24

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aattctaata cgactcacta tagggagaag ggagccagcc cgaagtctgt a 51

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

acatgaaggt gctccttgcc

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

gtccctgtgc cctactcctt

20

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

caggctgtct tgactgtcgt ga

22

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

aggagagaaa ggatttggt

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29  
gatccagggc ggagacttca 20

<210> 30

<211> 53

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30  
aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaggctgtc ttgactgtcg tga 53